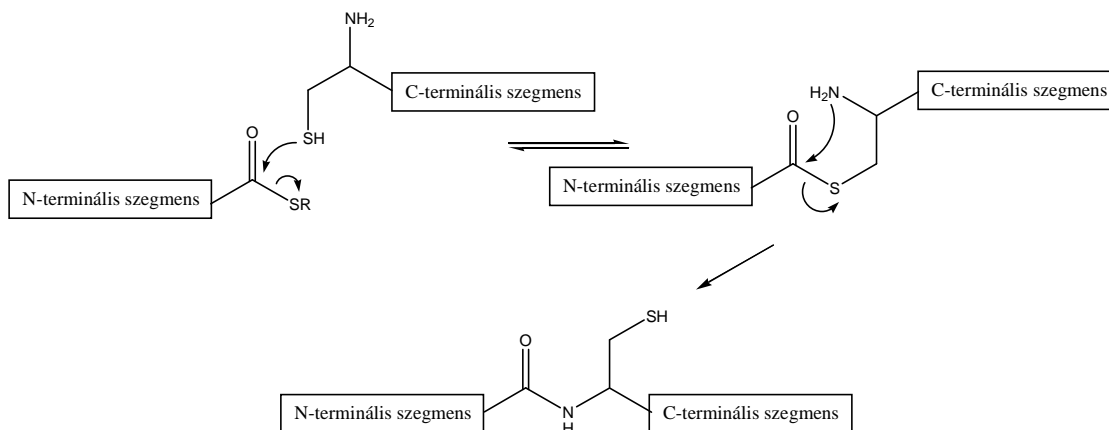


Szakmai zárójelentés az F49222 számú “Fehérjék előállítása kémiai módszerekkel szerkezeti és funkcionális vizsgálatok céljára” című OTKA pályázathoz

A pályázatban megfogalmazott kutatás célja olyan a fehérjék minél szélesebb körében alkalmazható szintézismódszer kidolgozása volt, amely lehetővé teszi mutagenézissel nem elérhető, kovalens szerkezetükben specifikusan módosított fehérjék előállítását kémiai módszerek segítségével. A módszer kulcslépése a C-terminális végen tioészter funkciót, illetve az N-terminális végen tiol funkciót hordozó peptid vagy fehérje szegmensek közötti natív kémiai ligációs reakció:



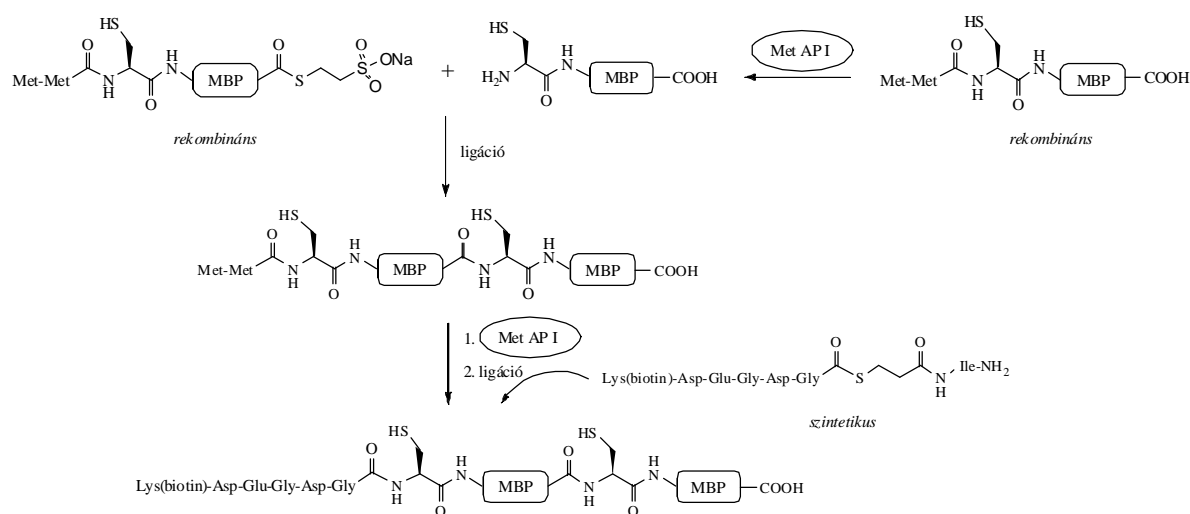
A reakciók optimalizálását és validálását eredetileg az M.Sss.I. citozin specifikus C-5 metiltranszferáz enzim (EC 2.1.1.37) előállításán keresztül terveztem megvalósítani. A modell fehérjét azonban megváltoztattam, mivel intézetem belüli együttműködés keretében hozzájutottam egy másik fehérjéhez, az *E. coli* maltóz-kötő fehérjéhez (MBP) expressziós rendszeréhez. Így módomban állt egy még általánosabb félszintetikus módszert kidolgozni, amely nem pusztán szintetikus oligopeptidek kémiai ligációján alapul, hanem lehetővé teszi rekombináns fehérje szegmensek alkalmazását is a kémiai ligációs reakciókban. Ez utóbbi azért nagyon fontos, mert meggyorsítja olyan fehérjeszármazékok előállítását, ahol csak egy rövidebb szekvencia szakasz különbözik a natív szekvenciától. Vagyis a célfehérje natív és módosított szegmensekre bontható, amelyek célszerűen rekombináns és szintetikus módszerekkel állíthatók elő.

Első lépésként megteremtettem laboratóriumunkban a bakteriális munkákhoz szükséges steril körülményeket, beállítottam a nukleinsavak vizsgálatához szükséges DNS preparálási és agaróz gélelektroforézis, valamint a fehérjék vizsgálatához szükséges poliakrilamid gélelektroforézis technikákat a MBP előállításán keresztül. A fehérjét C-terminális végén mutált Mxe GyrA inteinnel és *Bac.circulans* WL-12 kitináz kitin-kötő doménjével közös fúzióként expresszáltam *E. coli*-ban. Az ehhez szükséges plazmidot Welker Ervin bocsátotta rendelkezésemre. A plazmidot BL21-goldDE3 törzsbe transzformáltam, majd szekvenálással ellenőriztem a plazmid változatlanosságát. A sejtek feltárása után a fúziós fehérjét a konstrukció kitin-kötő doménjének felhasználásával affinitáskromatográfia segítségével kitin-agaróz fázison tisztítottam. A kitin agaróz fázisra kötött

intein fúzióból ditiotreitol segítségével C-terminális karboxil funkcióval (Met-Met-MBP-COOH), míg nátrium-2-merkaptó-etánszulfonát alkalmazásával C-terminális tioészter származékként (Met-Met-MBP-COSR) hasítottam a MBP-t. Mivel a félszintetikus módszer kulcslépése a C-terminális végen tioészter funkciót, illetve az N-terminális végen tiol funkciót (Cys) hordozó peptid vagy fehérje szegmensek közötti kémiai ligációs reakció, ezért kettőnél több szegmens lépésenkénti ligációja megköveteli minden köztes szegmens N-terminális védelmét. Az N-terminális Met-Met dipeptid szolgál a Cys átmeneti védelmére, amelyet egy mutáns metionin aminopeptidáz (Met AP I) alkalmazásával távolítok el. A szükséges M329A/Q356A *S. cerevisiae* MetAP I mutáns enzimet glutation S-transzferázzal fúzióban *E. coli* BL21 sejtekben expresszáltam, majd affinitás kromatográfiával tisztítottam. Az enzim proteolitikus aktivitását különböző szekvenciájú, N-terminális Met-t tartalmazó peptidek emésztésével vizsgáltam. Sikertelenül olyan reduktív körülményeket találni, ahol a metalloproteáz Met AP I mutáns a modell peptidek N-terminális Met aminosavait kvantitatívan és szelektíven emészt, ugyanakkor a szubsztrát és termék Cys tartalmú peptidek nem oxidálódnak diszulfidokká. Kiderült továbbá, hogy a glutation S-transzferáz fúzióban expresszált mutáns Met AP I jelentős enzimaktivitást mutat közvetlenül az affinitáskromatográfiás tisztítást követően glutation-szefaróz hordozóhoz kötve is, így kvázi-immobilizált enzimként használható. Ez leegyszerűsíti alkalmazását, hiszen az enzimatisztítás után egyszerű szűréssel 100%-ban eltávolítható és így nem okoz mellékreakciót a ligációs reakciólépésben. Ez lehetővé tette, hogy a MBP N-terminális irányú módosítását modellezzem. A fehérje N-terminális szekvenciájának megfelelő Met-Met-Cys-Lys-Ala-Ser-Asn-Met-Gly-NH₂ nonapeptid N-terminális Met-jait leemésztve a kapott heptapeptidet 4-merkaptó-fenil ecetsav jelenlétében kvantitatívan ligáltam 4 h alatt a Lys(biotin)-Asp-Glu-Gly-Asp-Gly-COS-(CH₂)₂-CONH-Ile-NH₂ peptid-tioészterrel. Az utóbbi peptid-tioésztert azért terveztem, hogy egy olyan, vizes közegben nagyon jól oldódó, biotinnal jelzett származékot kapjak, amellyel a konszekutív ligációs reakciók során főlegben maradó tiol komponenst avidin affinitáskromatográfia alkalmazásával eltávolíthatom (analóg a szilárd fázisú peptidszintézis capping lépésével), és ezáltal a hiányos szekvenciák kialakulását kiküszöbölhetem.

A kutatás következő fázisában a peptidek és peptidszármazékok segítségével optimalizált körülményeket a rekombináns MBP származékokra adoptáltam. Amíg azonban a peptidek esetében minden reakció előrehaladását HPLC analízissel tudtam követni, addig a MBP származékok esetében az N-terminális Met aminosavak emésztését közvetlenül nem tudtam követni, mivel a Met-Met-MBP és MBP fehérjék nem választható el sem elektroforetikus mobilitás alapján, sem ioncsere-, illetve gélkromatográfia alkalmazásával. Ezért közvetett módszert dolgoztam ki, amellyel a fehérje N-terminális Met aminosavainak emésztése követhető. A Met-Met-MBP emésztési elegyből kromatográfiás elválasztással izoláltam a Met-t, majd GITC származékképzést követően

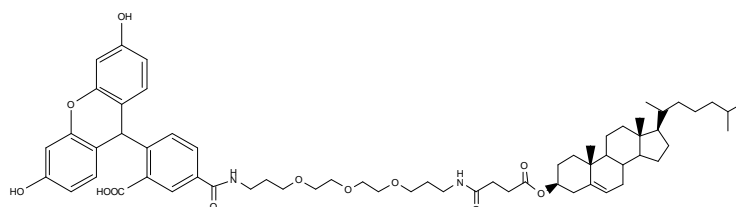
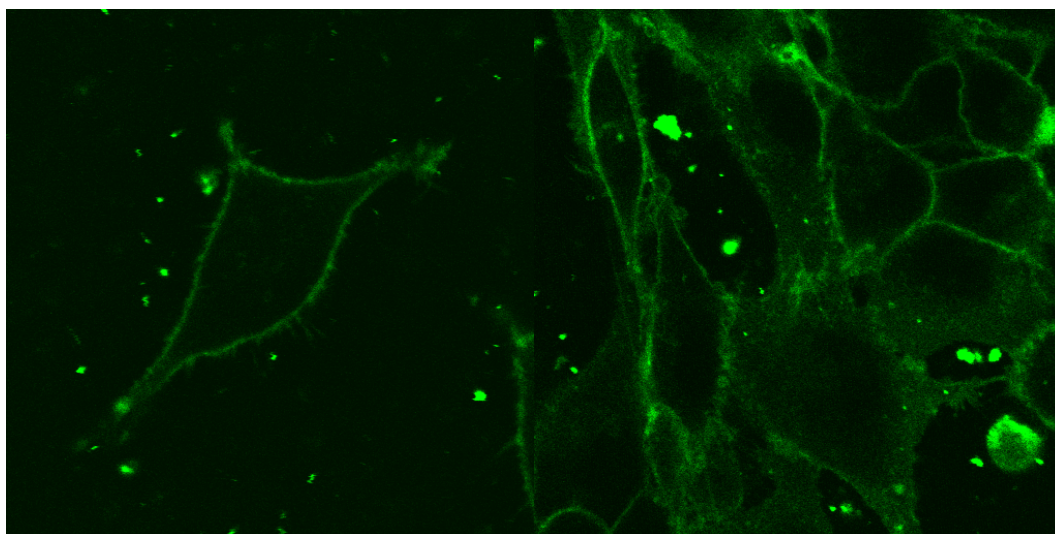
meghatároztam a koncentrációját HPLC elválasztást követő UV kromatogram analízissel. A fehérje emésztését szintén redukzív körülmények között kellett végezni, mert ellenkező esetben az emésztés során dimerizációt (Met-Met-MBP-COOH esetében), illetve oligomerizációt (Met-Met-MBP-COSR esetében) tapasztaltam. Kiderült továbbá, hogy a kvázi-immobilizált Met AP I enzim 2 M karbamid jelenlétében is megőrzi aktivitását, vagyis más, nehezen hozzáférhető N-terminális véggel rendelkező fehérjék esetén ilymódon alkalmazható Met-Met hidrolízisre. Így a Met-Met-MBP fehérje emésztéséhez optimális körülményeket állítottam be, majd Met-Met-MBP-COS-(CH₂)₂-SO₃Na fehérje tioésztert ligáltam hozzá. Az így kapott, ismét N-terminális Met-Met dipeptidet tartalmazó fehérje dimert újra a kvázi-immobilizált mutáns Met AP I enzimmal emésztettem, majd Lys(biotin)-Asp-Glu-Gly-Asp-Gly-COS-(CH₂)₂-CONH-Ile-NH₂ peptid-tioésztert ligáltam hozzá. A kapott félszintetikus fehérjét sztreptavidin affinitáskromatográfia segítségével izoláltam.



Megkísértem egy olyan, a fehérjemolekula C-terminális végére ligálható affinitásvég előállítását is, amellyel a C-terminális fehérje szegmens szilárd hordozóhoz köthető az C→N irányú ligációs reakciók idejére, és amely a szintézis végén enzimatisz hidrolízissel (elasztáz) eltávolítható. Ehhez a Cys-COO-Ahx-Gly-His₆-NH₂ hexahisztidin depszipeptid származékot állítottam elő szilárd fázisú szintézis segítségével. Ez a depszipeptid azonban a ligáció körülményei között elhidrolizált, így nem tudtam szilárd fázisú lépésenkénti ligációra alkalmazni.

A rekombináns és/vagy szintetikus szegmensek konszekutív ligációján alapuló módszer kifejlesztésén túl egy a prion fehérje szerkezetvizsgálatát elősegítő származék előállítását is elkezdtem. Ennek célja, hogy a prion fehérjét a természetes állapotának megfelelő formában, sejmembránhoz kötötten lehessen vizsgálni. Ehhez egy olyan horgonymolekulát terveztem, amely a C-terminális végen Cys-nel meghosszabbított prion fehérjéhez regioszelektíven kapcsolható és amely stabilan integrálódik sejmembránokba. A membránba horgonyzást koleszterin segítségével terveztem elérni, melyhez trisz-etilén-glikol linkeren keresztül maleimid funkciót kötök, amely a C-

terminális végén Cys-nel meghosszabbított prion fehérje megkötésére szolgál. A horgonymolekula sejtmembránba való beépülésének vizsgálatához fluoreszceinnel jelzett trisz-etilén-glikol koleszterin-hemiszukcinát észtert állítottam elő, amelynek liposzóma membránba, illetve sejtmembránnal történő fúziót követően sejtmembránba való beépülését Welker Ervinnel együttműködve vizsgáltuk. Konfokális mikroszkópiás vizsgálatok rámutattak, hogy a fluoreszceinnel jelzett koleszterin-trisz-etilén-glikol származék stabilan beágyazódik a liposzóma membránba, sőt az így jelzett liposzómák fuzionáltathatók egér Zpl idegsejtekkel. Vagyis a horgonymimetikum alkalmas fehérjék liposzóma membránhoz horgonyzására, majd sejtekkel történő fúziót követően sejtmembránokhoz horgonyzására.



A nem kódolt aminosavak, fluoreszcens és izotópos jelek, valamint poszttranszlációs módosítások jól definiált pozíciókba történő beépítése szintén fontos eleme kutatómunkámnak. Ehhez szükségesek a megfelelő kismolekulájú peptideken végzett kísérletek. Sikeresen előállítottam egy stabil β -kanyar szerkezet mimetikumot, a 4-amino-1,2,4,5-tetrahidro-2-benzazepin-3-on spirociklusos származékát, amelyről igazoltuk, hogy a Tyr-Pro-Phe-Phe és a Ser-Pro-Phe-Arg szekvenciákba építve is β -kanyar szerkezetet indukál és fokozza az egyébként kisebb mértékben β -kanyar szerkezetet felvevő endomorfín-2 és substance P peptidek biológiai aktivitását. Vagyis ezekben az esetekben a kanyarszerkezet kikényszerítése előnyösen befolyásolta a receptor – ligandum kölcsönhatásokat. Egy új nem-természetes aminosav, a β -metil-ciklohexilalanin Dmt-Tic-Cha-Phe szekvenciába építésével szintén a biológiai aktivitás növelését értük el. Ezek a nem

természetes aminosavak a továbbiakban alkalmasak fehérjemolekulák harmadlagos szerkezetének befolyásolására is.

Összefoglalás

A sikeres genom projektek szükségszerű folytatása az egyedi fehérjemolekulák szerkezeti szintű tanulmányozása. Az ehhez szükséges specifikusan módosított fehérje származékok előállítására a rekombináns és szintetikus módszerek kombinációja versenyképes megoldást jelent. A kémiai szintézis ugyanis lehetőséget ad a riboszómális fehérjeszintézis kereteinek kibővítésére, vagyis olyan kémiai információban gazdagított, illetve funkcióban módosított fehérje származékokhoz juthatunk, amelyek a jelenlegi molekuláris biológiai módszerekkel nem elérhetők.

Kutatásom során félszintetikus fehérjék előállítását értem el rekombináns fehérjék és szintetikus peptidek natív kémiai ligációs kapcsolásával. Mindezt olyan átmeneti védőcsoport és enzimátikus védőcsoport eltávolító módszer alkalmazásával, amely nem denaturáló körülmények között is alkalmazható, vagyis funkcionális fehérjék előállítását teszi lehetővé. A kidolgozott félszintetikus módszer méretnövelést követően alkalmas terminális és köztes fehérjeszekvenciák helyspecifikus módosítására. Ezen túlmenően megalapoztam a prion fehérje sejtmembránba integrálható félszintetikus származékának előállítását is.